

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005630

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-080611  
Filing date: 19 March 2004 (19.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

18. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月19日

出願番号  
Application Number: 特願2004-080611

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

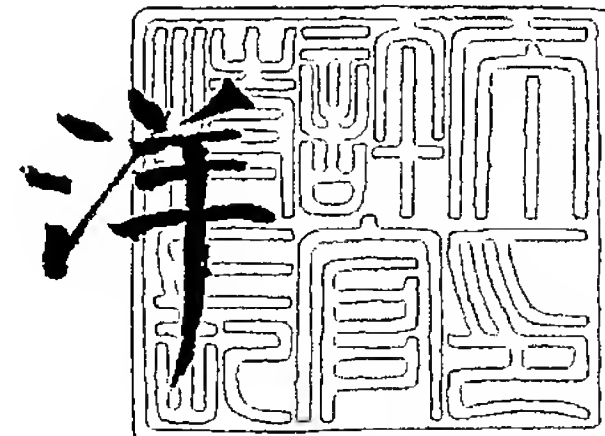
J P 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所  
三井情報開発株式会社  
株式会社島津製作所

2005年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 K1040248  
【提出日】 平成16年 3月19日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07D233/91  
H01J 49/26

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター内  
【氏名】 亀山 昭彦

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター内  
【氏名】 成松 久

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都中野区本町 1 丁目 3 2 番 2 号 三井情報開発株式会社内  
【氏名】 菊池 紀広

【発明者】  
【住所又は居所】 京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内  
【氏名】 中家 修一

【特許出願人】  
【識別番号】 503063766  
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】  
【識別番号】 599000980  
【氏名又は名称】 三井情報開発株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 000001993  
【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】  
【識別番号】 100095670  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小林 良平

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 019079  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9116525

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

分析目的糖鎖を開裂質量分析することにより得られる測定MS2フラグメントパターンに含まれる各MS2フラグメントイオンの更に開裂質量分析パターンである測定MS3フラグメントパターンをデータベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンと照合することにより分析目的糖鎖構造の同定を行う、質量分析装置を用いた糖鎖構造同定方法において、

測定MS2フラグメントパターンに含まれる複数のMS2フラグメントイオンのうち、データベースに記憶されている、その質量電荷比をプリカーサイオン質量電荷比とする複数の参照MS3フラグメントパターンの相互の類似度が所定値以下の測定MS2フラグメントイオンのみを開裂質量分析することを特徴とする糖鎖構造同定方法。

**【請求項 2】**

更に、データベースに参照MS4フラグメントパターン又はそれ以上の開裂が行われたMSn参照フラグメントパターンが記憶されており、測定されたMS4フラグメントパターン又はそれ以上の開裂が行われたMSn測定フラグメントパターンとの照合を行うことにより糖鎖構造の同定を行う糖鎖構造同定方法であって、上記と同様に、複数の参照MSn+1フラグメントパターンの相互の類似度が所定値以下の測定MSnフラグメントイオンのみを開裂質量分析することを特徴とする請求項 1 に記載の糖鎖構造同定方法。

**【請求項 3】**

分析目的糖鎖を開裂質量分析することにより得られる測定MS2フラグメントパターンに含まれる各MS2フラグメントイオンの更に開裂質量分析パターンである測定MS3フラグメントパターンをデータベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンと照合することにより分析目的糖鎖構造の同定を行う、質量分析装置を用いた糖鎖構造同定方法において、

測定MS2フラグメントパターンに含まれる複数のMS2フラグメントイオンのうち、データベースに記憶されている、その質量電荷比をプリカーサイオン質量電荷比とする複数の参照MS3フラグメントパターンの相互の類似度が低いMS2フラグメントイオンから順に開裂質量分析することを特徴とする糖鎖構造同定方法。

**【請求項 4】**

更に、データベースに参照MS4フラグメントパターン又はそれ以上の開裂が行われたMSn参照フラグメントパターンが記憶されており、測定されたMS4フラグメントパターン又はそれ以上の開裂が行われたMSn測定フラグメントパターンとの照合を行うことにより糖鎖構造の同定を行う糖鎖構造同定方法であって、上記と同様に、複数の参照MSn+1フラグメントパターンの相互の類似度が所定値以下の測定MSnフラグメントイオンのみを開裂質量分析することを特徴とする請求項 3 に記載の糖鎖構造同定方法。

**【請求項 5】**

上記参照MSn+1フラグメントパターン相互の類似度が、プリカーサイオンの質量電荷比に関連づけてデータベースに記憶されていることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の糖鎖構造同定方法。

**【請求項 6】**

測定MSnフラグメントパターンにおけるピーク強度が所定値以上のMSnフラグメントイオンのみを対象とすることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の糖鎖構造同定方法。

**【請求項 7】**

測定MSnフラグメントパターンから糖鎖の理論組成を算出し、それに基づいて、データベースに記憶されている参照MSn+1フラグメントパターンのうち、照合の対象とすべきものを予め限定しておくことを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の糖鎖構造同定方法。

**【請求項 8】**

開裂質量分析に際し、開裂エネルギーを、プリカーサイオンに応じて定まる所定値以上

とすることを特徴とする請求項 1～7 のいずれかに記載の糖鎖構造同定方法。

【請求項 9】

上記開裂エネルギーの所定値がデータベースに記憶されていることを特徴とする請求項 8 に記載の糖鎖構造同定方法。

【請求項 10】

2つのフラグメントパターンの類似度を次の方法で決定することを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載の糖鎖構造同定方法。

a) 第 1 のフラグメントパターンにおいて、質量電荷比が所定の範囲内にあるピークを 1 つにまとめ、その中で最も強度の高いピークをその範囲を代表するピークとする。

b) 第 2 のフラグメントパターンにおいて、上記と同じ範囲分けにより同様に代表ピークを選択する。

c) 両フラグメントパターンの各範囲内の代表ピークの強度を要素とする 2 つのベクトルのユークリッド距離を相違度とし、該相違度に基づき類似度を決定する。

【請求項 11】

第 1 のフラグメントパターンに対して上記相違度が所定値以下である第 2 フラグメントパターンについて、第 1 及び第 2 を入れ替えて上記手順を繰り返して第 2 相違度を算出し、第 2 相違度に基づいて類似度を決定することを特徴とする請求項 10 に記載の糖鎖構造同定方法。

【請求項 12】

イオン保持・開裂手段を備えた質量分析部と、  
既知の糖鎖のMSnフラグメントパターンを記憶したデータベース部と、  
請求項 1～11 のいずれかに記載の方法に基づいて上記質量分析装置を制御するとともに、分析目的糖鎖の同定を行うデータ処理部と、  
を備えることを特徴とする糖鎖解析用質量分析装置。

【請求項 13】

請求項 1～11 のいずれかに記載の方法を実施するためのプログラム。



【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖構造同定方法及び同解析装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、質量分析装置を用いた糖鎖構造の解析システムに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトゲノムのドラフトシーケンスデータ公開により、研究開発のフェーズはポストゲノム研究としてタンパク質の機能・構造解析と相互作用解析に移っている。一方、生体内においてタンパク質の約半数が翻訳後に糖鎖による修飾を受けており、そのような修飾を受けることによって初めて本来の機能を発揮することが明らかとなりつつある。従って、糖タンパク質の機能の解明は、ゲノム創薬や再生医療等を実現するために不可欠なアプローチである。すなわち、次世代ポストゲノム研究として、糖鎖とタンパク質を一体として網羅的に解析し、その機能の解明を目指す「グライコプロテオミクス」の視点から研究開発を進めることが必要であり、特に機能・構造解析の困難な糖鎖を迅速に解析できる新たな技術開発が望まれている。

【0003】

糖鎖はタンパク質等の安定性や局在性に深く関わっており、細胞表面にあっては認識分子として機能するなど、細胞の高次な生命機能の発現に重要な役割を果たしている。しかし、糖鎖は、構成糖の種類や、糖の結合順序、構成糖間の結合様式やアノマー構造の違いなどにより、きわめて高い多様性を有する。例えば、構成糖のうち、グルコース(Glc)、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)は分子量が同じ、異性体である。構成糖の種類は多くはないと考えられているが、多くの糖鎖は構成糖が数十個程度結合したものであるため、その結合の組み合わせは極めて多数にのぼる。それに加えて、枝分かれ構造による異性体、 $\alpha$ 、 $\beta$ アノマー異性体等の異性体が存在し、硫酸化、リン酸化などの修飾を受けているものもある。

【0004】

これらの多様性を有する上、分析を更に困難にしているのが、糖鎖は微量にしか存在しないという点であり、しかも現在のところ、糖鎖を増幅する手法は未だ開発されていない。

【0005】

糖鎖構造の解析法として、現在まで、加水分解酵素やHPLCを用いた手法、レクチンアフィニティークロマトグラフィー、メチル化分析、質量分析、NMRなどを利用した手法等、種々の手法が開発されている（非特許文献1）が、いずれも単独で糖鎖の完全な構造情報が得られるものではなく、複数の手法を組み合わせた解析を行う必要がある。そのため、1つの糖鎖を解析するには、煩雑な操作と多くの時間が必要であり、ハイスループットな解析を行うことができなかった。

【0006】

高速性及び操作の容易性の点より、上記のような種々の解析法の中でも、質量分析を用いた手法が今後の糖鎖構造解析の主流となるものとして期待されている。

【0007】

しかし、従来より行われているMS/MS ( $MS^2$ ) による質量分析法では、アノマー異性体や構造異性体などを区別することができないという問題があった。

【0008】

そこで、糖鎖イオンの [(i)断片化] - [(ii)断片イオンの質量測定及び選択] - [(iii)さらなる断片化] を多段階繰り返す ( $MS^n$ ) ことにより、糖鎖の複雑な構造情報を得ることが期待される（非特許文献2）。しかし、断片化毎に開裂イオンが場合によっては数十から数百も生成されるため、これら全ての開裂イオンに対して更なる断片化を行い、照合（パターンマッチング）を行ってゆくのは非現実的である。また、主要な開裂イオンだけに絞って更なる断片化を行うにしても、試行錯誤で行っていたのでは大量のサンプルが必

要となる。

【0 0 0 9】

【非特許文献 1】大倉, 亀山「糖鎖構造解析の現状と将来」, バイオインダストリー, シーエムシー出版, 2003年1月, 18-24

【非特許文献 2】Y. Takegawa, et al., "Structural assignment of isomeric 2-am inopyridine-derivatized oligosaccharides using MSn spectral matching", Rapid Commun. Mass Spectrum, 2004; 18: 385-391

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 0】

本発明が解決しようとする課題は、微量のサンプルで、簡便且つ迅速に糖鎖の完全な一次構造を決定することのできる、糖鎖構造解析システムを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 1】

本願発明者らは、質量分析のみで糖鎖構造を迅速に決定できる手法を求めて鋭意研究を重ねた結果、生成された開裂（フラグメント）イオンの中から適切なイオンを選択し、それ（又はそれら）について次段階の開裂を行うことにより、迅速且つ正確に異性体や単糖間の結合位置の情報を含めた、糖鎖の完全な一次構造情報を得られる方法を見いだした。

【0 0 1 2】

すなわち、上記課題を解決するために成された本発明は、分析目的糖鎖を開裂質量分析することにより得られる測定MS2フラグメントパターンに含まれる各MS2フラグメントイオンの更に開裂質量分析パターンである測定MS3フラグメントパターンをデータベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンと照合することにより分析目的糖鎖構造の同定を行う、質量分析装置を用いた糖鎖構造同定方法において、

測定MS2フラグメントパターンに含まれる複数のMS2フラグメントイオンのうち、データベースに記憶されている、その質量電荷比をプリカーサイオン質量電荷比とする複数の参照MS3フラグメントパターンの相互の類似度が所定値以下の測定MS2フラグメントイオンのみを開裂質量分析することを特徴とする。

【0 0 1 3】

前記の通り、糖鎖には様々な異性体が存在するため、それらを質量分析で区別することは難しいと考えられてきた。しかし、それらも、開裂を繰り返すことにより、そのフラグメントパターンに差異が生じることが明らかとなってきた。現在では、MS3までのフラグメントパターンを採取することにより、殆どの糖鎖についてその構造を同定することができると考えられている。

【0 0 1 4】

しかし、MS3フラグメントパターンを得るためには、原糖鎖から2段階の開裂を行うことになるため、1つの糖鎖から得られるMS3フラグメントパターンの数は膨大なものとなる。未知糖鎖から得られるMS3フラグメントパターン（これを測定MS3フラグメントパターンと呼ぶ）とデータベースに記憶されているMS3フラグメントパターン（これを参照MS3フラグメントパターンと呼ぶ）を何の指針も無しに順にパターンマッチングさせてゆくことは、いたずらに時間を消費するばかりではなく、正確なパターンマッチング（同定）をも妨げる恐れがある。

【0 0 1 5】

そこで本発明では上記の通り、1つの測定MS2フラグメントパターンに含まれる複数のMS2フラグメントイオンのうち、その質量電荷比をプリカーサイオン質量電荷比とする参照MS3フラグメントパターン相互の類似度が予め定められた値（第1所定値）以下のMS2フラグメントイオンのみを開裂質量分析するようにしたものである。

【0 0 1 6】

ここで、そのようなMS3フラグメントパターンが3つ以上存在する場合は、それらの中の任意の2個の組み合わせの類似度の中で最も高いものを上記類似度の指標として採択す

ることができる。

【0 0 1 7】

データベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターン相互の類似度が高い場合、未知試料についてMS3分析を行ってMS3フラグメントパターンを測定しても、いずれの方にパターンマッチするかを判定し難い。そこで、本発明に係る方法により、MS3フラグメントパターン相互の類似度が低いMS2フラグメントイオンから先に（又は低い方から順に）開裂質量分析を行い、MS3フラグメントパターンの照合（マッチング）を行うことにより、より速く同定を行うことができる。

【0 0 1 8】

上記のMS3フラグメントパターン相互の類似度は、予め、プリカーサイオンの質量電荷比に関連づけてデータベースに記憶しておくことが望ましい。これにより、より迅速なパターンマッチングを行うことができるようになる。

【0 0 1 9】

上記選択されたMS2フラグメントイオンについては、所定の基準により順位付けしておくことが望ましい。この順位付けには、上記参照MS3フラグメントパターン相互の類似度を利用することができる。また、データベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンの数の多さを勘案してもよい。その順位に従って順次開裂質量分析を行ってゆき、分析によって得られた未知試料のMS3フラグメントパターンとデータベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンの類似度が予め定められた値（第2所定値）以上である場合に、そこで分析を終了し、マッチしたパターンにより糖鎖構造を同定する。

【0 0 2 0】

なお、このような処理の対象とするMS2フラグメントイオンは、測定MS2フラグメントパターンにおけるピーク強度が所定値以上のもののみとしておくことが望ましい。

【0 0 2 1】

また、上記手順で同定を行う際、それら前に、測定された（プリカーサイオンのピークを含む）MS2フラグメントパターンから糖鎖の理論組成を算出し、それに基づいて、データベースに記憶されているMS2フラグメントパターン及びMS2フラグメントイオンの中から測定MS2フラグメントパターン及びフラグメントイオンと照合すべきものを予め選択しておく（絞っておく）ことが望ましい。

【0 0 2 2】

上記手順は、MS2フラグメントイオンを更に開裂質量分析するに於ける指針を示したものであるが、本発明に係る方法は、それ以上の段階の開裂により生成されたフラグメントイオン（MS<sub>n</sub>フラグメントイオン）の中で、どれを先に更なる開裂質量分析するかを決定する際にも同様に利用することができるものである。上記の通り、殆どの糖鎖についてはMS3フラグメントパターンを照合することにより構造の同定を行うことができると考えられるが、一部の複雑な、或いは異性体構造の差異が微妙である糖鎖に関しては、MS4又はそれ以上の開裂を行う必要があり得る。その場合に、本発明に係る方法を指針として用いることにより、更なる効率化を図ることができる。

【0 0 2 3】

以上、各段階で開裂質量分析を行うに際しては、プリカーサイオンの開裂エネルギーを、そのプリカーサイオンに応じて定まる所定値以上とすることが望ましい。このエネルギー値を、プリカーサイオンがほぼ完全に開裂する程度の値としておくことにより、開裂により生成されるフラグメントパターンの再現性が良好なものとなり、糖鎖構造同定の信頼性を高めることができる。なお、この所定の開裂エネルギー値は、プリカーサイオンに対応づけてデータベースに記憶しておくことが望ましい。

【発明の効果】

【0 0 2 4】

質量分析は、複雑且つ多様な糖鎖の構造解析を迅速に行い得る手法として期待されているが、正しい同定を行うためには、糖鎖イオンの [(i)断片化] - [(ii)断片イオンの質量測定及び選択] - [(iii)さらなる断片化] を繰り返し、少なくともMS3フラグメントパ



ターンまでパターンマッチングを行う必要があるとされている。しかし、断片化毎に開裂イオンが場合によっては数十から数百も生成されるため、これら全ての開裂イオンに対して更なる断片化を行い、照合（パターンマッチング）を行ってゆくのは非現実的である。また、主要な開裂イオンだけに絞って更なる断片化を行うにしても、試行錯誤で行っていたのでは大量のサンプルが必要となる。

#### 【0025】

本発明に係る糖鎖構造解析方法では、その更なる断片化を行うに際して有益な指針を与えるものであり、これにより、迅速に、目的とする同定にたどり着くことができるようになる。また、無駄な分析を行う必要がなくなるため、試料の消費量を抑えることができ、微量の試料であっても十分な同定を行い得るようになる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0026】

以下、本発明を一つの実例によって詳しく説明する。図1は、本発明を実施するための糖鎖構造解析装置の概略構成を示すものであり、この装置はマトリックス支援レーザー脱離イオン化装置(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)MALDI、四重極電場型イオントラップ装置(Quadrupole Ion Trap)QIT、及び飛行時間形質量分析器(Time Of Flight)TOFを備えた質量分析装置MSと、データベースDBを含む解析装置ANLから成る。データベースDBには、構造が明らかとなっている糖鎖のイオン、並びにその第1次及び第2次(MS2及びMS3)の断片化イオン(フラグメントイオン)の質量分析パターン(フラグメントパターン)が多数記憶されている。解析装置ANLにはその他に、質量分析装置MSから送られてくるフラグメントパターン(データ)を、データベースDBに記憶されているフラグメントパターン(データ)と照合し、その類似度を算出する照合装置(Pattern Matcher)PMが備えられている。また、質量分析装置MSには、装置全体を制御する制御部CNTLが設けられている。

#### 【0027】

この装置を用いて、未知の糖鎖の構造解析を行う手順を、図15を用いて説明する。まず、糖タンパク質や糖脂質を含有する生体試料から、同定しようとする未知の糖鎖を切断酵素又は化学的切断反応を用いて切り出す。得られた糖鎖試料を必要に応じてラベル化し、マトリックス剤と混合して質量分析装置MSにかける。質量分析部MSでは、試料はMALDIによりイオン化され、TOFにより質量分析が行われる。これにより、その糖鎖のイオン(プリカーサイオン)の質量電荷比(質量 $m$ /電荷 $z$ )が測定される。また、イオントラップ装置QIT内で開裂を行うことによりそのフラグメントイオンを生成し、各フラグメントイオンの質量電荷比及び強度を測定する。これにより、MS/MSフラグメントパターン(測定MS2フラグメントパターン。MS2FPm)が得られる(ステップS1)。このMS2フラグメントパターンの例を図2に示す。この例では、プリカーサイオン(未知糖鎖試料のイオン)の質量電荷比 $m/z$ は2147.8となっている。MS2フラグメントパターンのデータは、質量分析装置MSから解析装置ANLに送られる。

#### 【0028】

解析装置ANLでは、このMS2フラグメントパターンのデータより、

- (1)プリカーサイオンの質量電荷比
- (2)各フラグメントイオンの質量電荷比
- (3)各フラグメントイオンの強度

を取り出す。解析装置ANLは、これらのデータ及びこの試料を採取する際に使用されたラベル化剤、切断酵素、試薬等の情報に基づき、糖鎖の理論組成を算出する(ステップS2)。なお、ラベル化剤等の情報は、分析者が質量分析装置MS側で入力してもよいし、解析装置ANL側で入力してもよい。

#### 【0029】

図2の例の場合、プリカーサイオンの質量電荷比2147.8より、糖鎖の理論組成は(He x)5(HexNAc)6であると決定される。

#### 【0030】

次に、解析装置ANLでは、算出された理論組成を有する全ての糖鎖異性体のMS2フラグメントパターン（参照MS2フラグメントパターン。MS2FPd）と、質量分析装置MSから送られてきたMS2フラグメントパターン（MS2FPm）との間の類似度Sを算出する。2つのフラグメントパターンの類似度S（相違度D）の算出方法については、後に詳しく説明する。そして、測定MS2フラグメントパターンとの類似度Sが所定値S21以上の参照MS2フラグメントパターンのみを予備選択する（ステップS 3）。

【0 0 3 1】

理論組成が(He x )5(HexNAc)6の場合、解析装置ANLのデータベースDBには糖鎖異性体のMS2フラグメントパターンとして、図3に示す4種のもものが記憶されている。各フラグメントパターンを呈する糖鎖構造模型をそのパターンの上に示す。図2の測定フラグメントパターンとの類似度Sが所定値S21以上のものは、(c)と(d)の2種のみである。

【0 0 3 2】

こうして予備選択された参照MS2フラグメントパターンより、強度の高い順にフラグメントピークを所定本数だけ選択する（ステップS 4）。ここにおけるフラグメントピークを選択は、予め本数を定めておいてもよいし、所定の強度レベル（最大ピークに対する相対強度レベル）以上のものを選択するようにしてもよい。

【0 0 3 3】

図3(c)、(d)の2つの参照MS2フラグメントパターンからは、次の6本のフラグメントピークを選択する。

m/z=2129

m/z=1848

m/z=1782

m/z=1645

m/z=1483

m/z=1280

【0 0 3 4】

こうして選択されたフラグメントピークの中から、次に質量分析装置MSにおいて開裂質量分析を行うべきフラグメントイオン（MS2フラグメントイオン）を選択する。ここで本発明に係る方法を用いる。

【0 0 3 5】

すなわち、選択されたフラグメントピークに対応するフラグメントイオンをプリカーサイオンとする、データベースDBに記憶されているMS3フラグメントパターンを読み出し（通常、1つのプリカーサイオンに対してMS3フラグメントパターンは複数記憶されている）、それらの間の類似度（後記の相違度Dではなく、類似している度合いが高いほど高い値を示す類似度）Sを算出する。そして、その類似度が所定値S22以下のMS2フラグメントイオンのみ、質量分析装置MSにおいて開裂質量分析を行うようにする（ステップS 5）。なお、この際、これらのMS2フラグメントイオンに、類似度の低い順に順位付けを行っておく（ステップS 6）。

【0 0 3 6】

上記選択された6個のフラグメントピークについて、それぞれに対応するMS3フラグメントパターンを図4に示す。これらのうち、m/z=1483をプリカーサイオンとする2個のMS3フラグメントパターン、及びm/z=1280をプリカーサイオンとする2個のMS3フラグメントパターンは、他のプリカーサイオンのMS3フラグメントパターンよりも、相互の類似度が低い。データベースDBに記憶されているこれら参照MS3フラグメントパターンを未知試料の測定MS3フラグメントパターンと照合（パターンマッチング）する場合、両参照MS3フラグメントパターンが相互に類似しているよりも、両者の類似度が低い（両者が離れている）方が、測定MS3フラグメントパターンがいずれにマッチングするかを判定しやすい。

【0 0 3 7】

なお、図4ではMS3フラグメントパターンをそれぞれ2個ずつ示したが、1つのプリカーサイオンに対して3個以上のMS3フラグメントパターンがデータベースDBに記憶されている

場合もある。その場合には、任意の2個のMS3フラグメントパターンの中の類似度を指標としてもよいが、相互の類似度が最も高い2個のMS3フラグメントパターンの中の類似度を指標とすることが望ましい。この場合、その他のMS3フラグメントパターンとの類似度はいずれもそれよりも低いということであるため、確実な測定/参照パターンマッチングを行うことができる。

【0038】

図4の場合、 $m/z=1280$ の方がMS3フラグメントパターン相互間の類似度が低いため、こちらを第1位、 $m/z=1483$ のMS2フラグメントイオンを第2位とする。

【0039】

解析装置ANLは、このような選択・順位付の結果に基づいて、質量分析装置MSに、次に開裂質量分析を行うべきプリカーサイオンの質量電荷比のデータを送る。質量分析装置MSでは、解析装置ANLから送られてくるデータに従い、イオントラップQIT内で生成されるMS2フラグメントイオンの中から指定されたフラグメントイオン（上記例の場合、 $m/z=1280$ のフラグメントイオン）のみを残し、それを所定のエネルギーで開裂してMS3質量分析を行う（ステップS7）。これにより得られる $m/z=1280$ （正確には $m/z=1280.4$ ）の測定MS3フラグメントパターンを図5に示す。

【0040】

測定MS3フラグメントパターンのデータは質量分析装置MSから解析装置ANLへ送られ、そこで図4の2段目の2個の参照MS3フラグメントパターンとの類似度がそれぞれ算出され、所定の閾値S31と比較される（ステップS8）。今の場合、図6に示すように、(a)の方が測定MS3フラグメントパターンとの類似度が高い。

【0041】

こうして、今回の分析試料である糖鎖は、図6(a)の上部に示す構造を有する(He x)5(HexNAc)6であると同定される（ステップS9）。

【0042】

次に、上記同定手順の中で用いた、未知試料の測定フラグメントパターンとデータベースに記憶されている参照フラグメントパターンの類似度算出のアルゴリズムを説明する。なお、以下のアルゴリズムの説明においては、上記の「フラグメントパターン」を「スペクトル」と呼ぶ。

【0043】

(1) 測定スペクトルと参照スペクトルそれぞれについて、 $m/z$ 値が或る値の範囲にあるピークを一つにまとめる（マージする）。それらのピークの中で最も強度が高いピークをマージ後のピークとする。

(2) 測定スペクトルのマージ後の $n$ 本のピーク ( $P_1, P_2, \dots, P_n$ ) の強度が $x_i$  ( $i=1 \sim n$ ) のとき、以下のようにスペクトルのベクトル $X$ を作成する。

$$X=(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

(3) 参照スペクトルについて、ピーク $P_i$ に相当する参照スペクトルのピークを決定し、そのピークの強度からスペクトルのベクトル $Y$ を作成する。

$$Y=(y_1, y_2, \dots, y_n)$$

(4) 以下のように、2つのベクトル $X$ と $Y$ のユークリッド距離からスペクトル間の相違度 $D1$ を求める。

$$D1=\sum (i=1 \sim n) (x_i-y_i)^2$$

ここで算出される値 $D1$ は、両スペクトルが全く同一の場合には0（ゼロ）であり、両スペクトルの差が大きくなるほど値が大きくなるため「相違度」と表現しているが、当然、両スペクトルの類似度の尺度となるものである。両スペクトルが近いほど大きい値とするためには、この相違度の逆数等で表現すればよい。

(5) 上記のように算出した相違度 $D1$ では、未知試料のスペクトル（測定スペクトル）に存在しないピークを持つ既知糖鎖構造（参照スペクトル）でも低い相違度（高い類似度）でヒットするので、測定スペクトルと参照スペクトルのベクトル算出方法を入れ替えて相違度 $D2$ を再計算する。つまり、相違度 $D1$ が所定の閾値以下の参照スペクトルについて、参



照スペクトルから上記ベクトルX、測定スペクトルから上記ベクトルYを算出し、相違度D2を求める。

【0 0 4 4】

上記相違度（類似度）算出方法の有効性を、実際のデータにより検証した。検証に用いた試料は、PAでラベル化した糖鎖を質量分析することにより得られたスペクトルである。マージする際のm/z値の範囲を0.8、ピーク同士が一致しているとみなすm/z値の範囲を0.5として計算をおこなった。また強度値としては、質量分析装置AXIMA-QIT（AXIMAは株式会社島津製作所の登録商標）が出力するピークリストの%AREA値（所定範囲内のピーク面積の値）を用いた。

【0 0 4 5】

(1) ONA-00001a(100.1)とONA-00001b(100.2)の比較

両者の構造式を図7(a)、(b)に示す。これら2種の異性構造体について、同一構造体試料を異なる実験由来で採取したスペクトル相互間の相違度と、異性体試料のスペクトル相互間の相違度を算出した結果を図8に示す。

図8の1段目は、ONA-00001a(100.1)のMS2スペクトル（プリカーサイオンの質量電荷比は1214）の相違度の計算結果である。中央の2列のデータは、同一の試料を異なる機会に質量分析して得られた場合の平均相違度の算出値を表し、右側の2列のデータは、異性体ONA-00001b(100.2)のMS2スペクトルとの間の相違度の値である。MS2スペクトルでは、同一試料との間の相違度と異性体試料間での相違度とは、あまり変わりはない。

図8の2段目は、ONA-00001a(100.1)のm/z=915のフラグメントイオンを更に開裂した質量分析スペクトル（MS3スペクトル）に関する相違度の計算結果である。上記同様、中央の2列のデータは同一の試料を異なる機会に質量分析して得られた場合の平均相違度であり、右側の2列のデータは異性体ONA-00001b(100.2)の同じくm/z=915のMS3スペクトルとの間の相違度である。MS3スペクトルまで分析を行うと、異性体試料間での相違度は、同一試料間での相違度よりも大きくなっている。図8の3段目は、m/z=1196のプリカーサイオンについての結果であるが、同じ結果を示している。

図8の4段目～6段目は、ONA-00001b(100.2)について同様の計算を行った結果である。m/z=1214をプリカーサイオンとするMS2スペクトル及びm/z=915をプリカーサイオンとするMS3スペクトルの測定結果では、同一試料同士の相違度の値と異性体間の相違度の値とに差はみられないが、m/z=1196をプリカーサイオンとするMS3スペクトルの結果では同一試料同士の相違度の方が異性体間の相違度よりも小さい。

【0 0 4 6】

(2) ONG-00001c(100.3)とONG-00001d(100.4)の比較

両者の構造式を図9(c)、(d)に示す。また、上記同様の相違度の計算結果を図10に示す。これらの試料では、いずれの場合においても、同一試料間の相違度は異性体試料間の相違度よりも遙かに小さくなっている。

【0 0 4 7】

(3) ONG-00001e(310.2)とONG-00001f(310.3)の比較

両者の構造式を図11(e)、(f)に、相違度の計算結果を図12に示す。この試料の場合、m/z=1280をプリカーサイオンとする場合の他は、同一試料間の相違度が異性体試料間の相違度よりも高くなっているが、これは両試料のピークの出方がやや異なっており、マージ操作によりその差が現れたものである。m/z=1280をプリカーサイオンとするMS3スペクトルでは、同一試料間の相違度が異性体試料間の相違度よりも低くなっている。従って、これで両異性体を区別することができる。

【0 0 4 8】

(4) ONG-000020(400.2)、ONG-000021(400.3)、ONG-000022(400.5)の3種の比較

それぞれの構造式は図13に示す通りである。MS2スペクトルからではこれら3種の異性体の区別はできない。しかし、特定のピークを選んでMS3を行うと区別ができる。特にm/z=1686, 1764, 1967のプリカーサイオンをピークとしたMS3スペクトルであれば、相違度の最も低い構造（最も類似した試料）が正しい糖鎖構造を表している。



## 【0 0 4 9】

以上の実験結果より、まず、上記算出方法が、2つのスペクトルの類似度（相違度）の判定を行うに有効であることが確認された。また、MS2段階では異性体間の構造の相違はスペクトルの類似度（相違度）の差異となって現れない場合であっても、MS3まで開裂質量分析を行うことにより、異性体構造の差異がスペクトル類似度（相違度）の計算により分別できるようになることが明らかとなった。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0 0 5 0】

【図1】 本発明を実施するための装置の概略構成図。

【図2】 本発明の一実施例において採取した測定MS2フラグメントパターン。

【図3】 上記測定MS2フラグメントパターンに対応する、データベースに記憶されている参照MS2フラグメントパターンとその構造模型。

【図4】 各種MS2フラグメントイオンをプリカーサイオンとするMS3フラグメントパターンの比較図。

【図5】  $m/z=1280$ のMS2フラグメントイオンの測定MS3フラグメントパターン。

【図6】 上記測定MS3フラグメントパターンに対応する、データベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンとその構造模型。

【図7】 2個のフラグメントパターン（スペクトル）の類似度（相違度）を算出するアルゴリズムの検証に用いた2種の試料の糖鎖構造式。

【図8】 同試料の相違度算出結果の表。

【図9】 上記アルゴリズムの検証に用いた別の2種の試料の糖鎖構造式。

【図10】 同試料の相違度算出結果の表。

【図11】 上記アルゴリズムの検証に用いた更に別の2種の試料の糖鎖構造式。

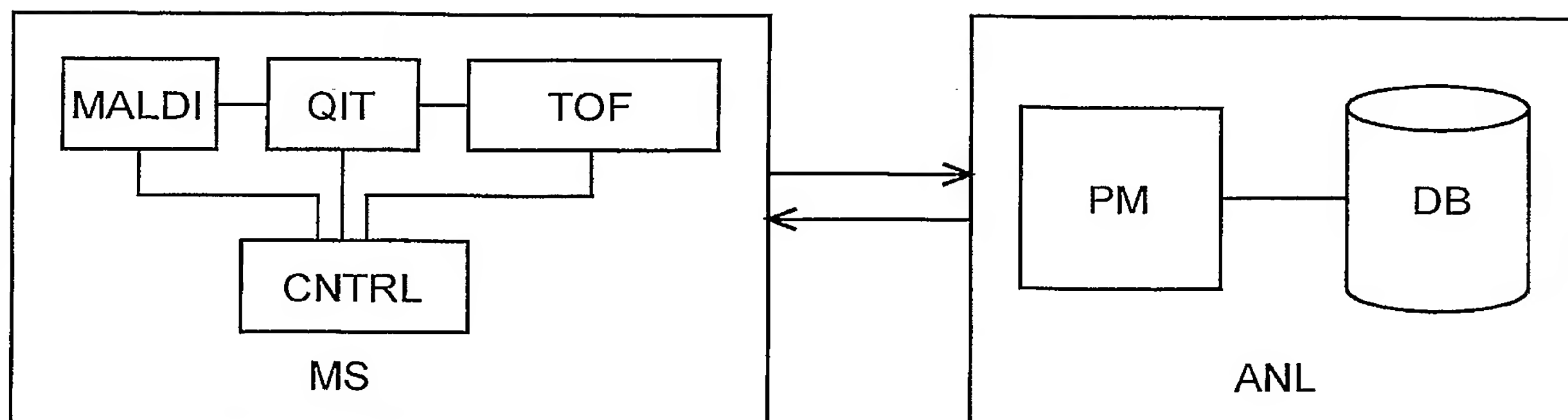
【図12】 同試料の相違度算出結果の表。

【図13】 上記アルゴリズムの検証に用いた更に別の3種の試料の糖鎖構造式。

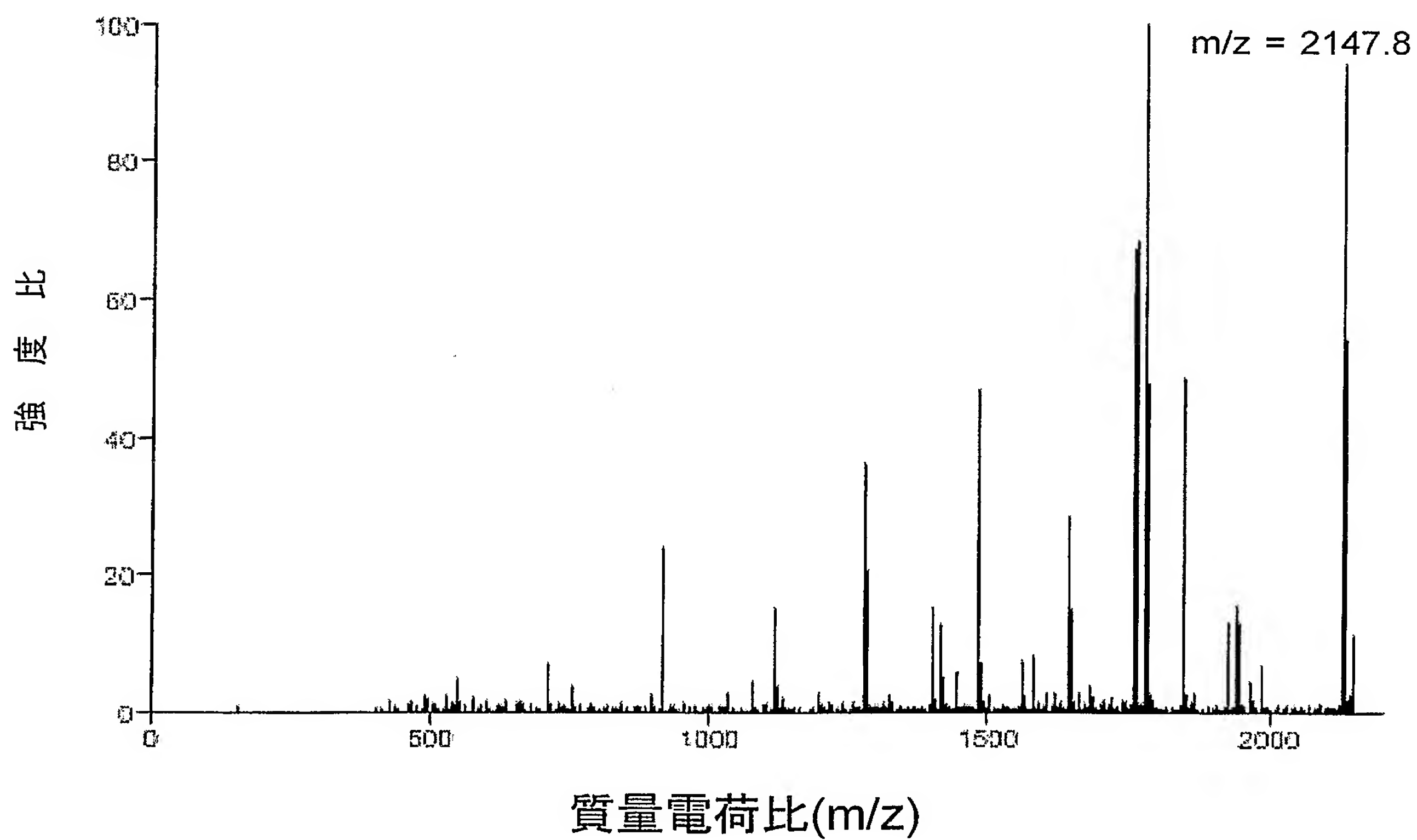
【図14】 同試料の相違度算出結果の表。

【図15】 本発明に係る方法の一実施例の方法の流れを示すフローチャート。

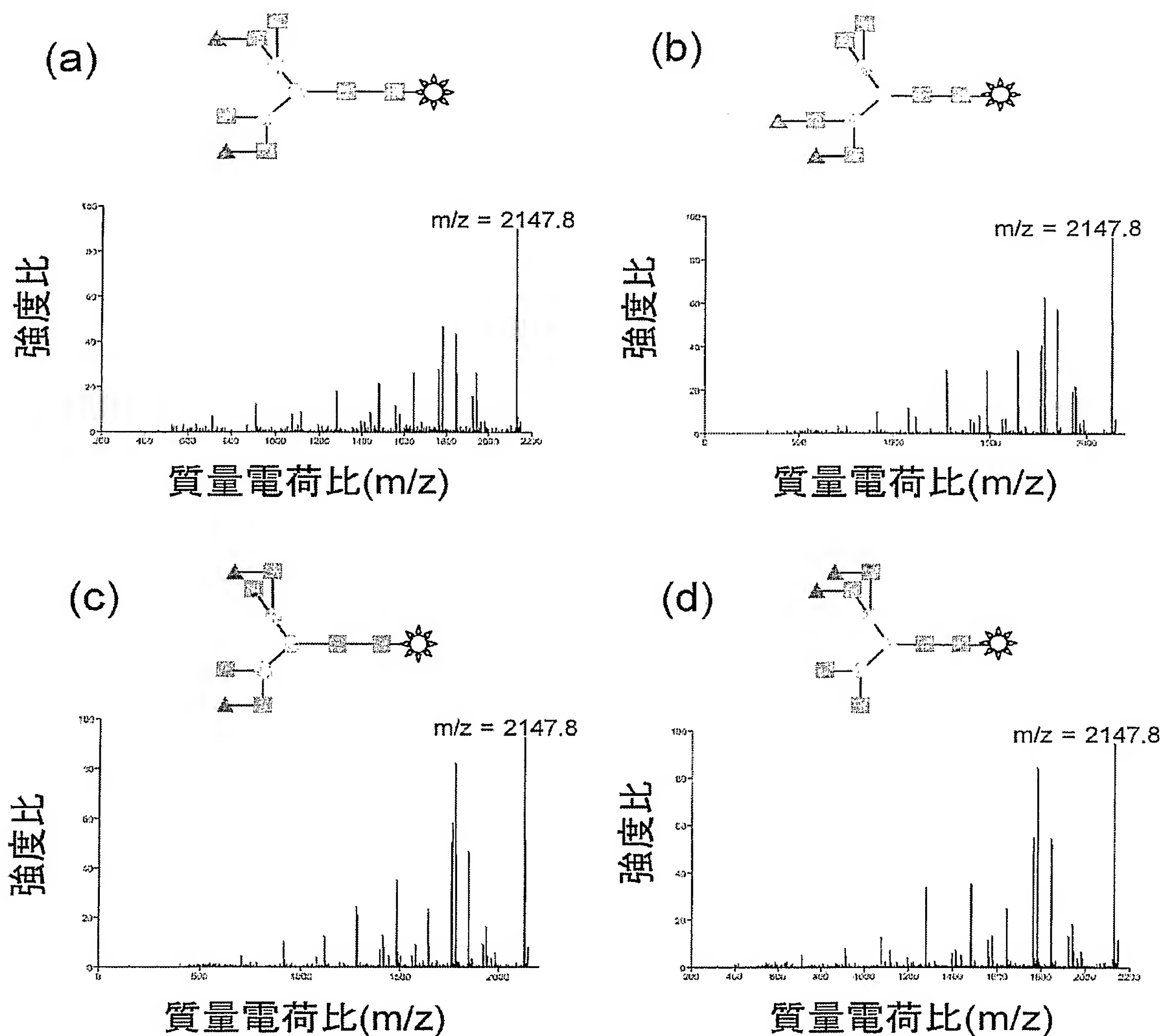
【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】

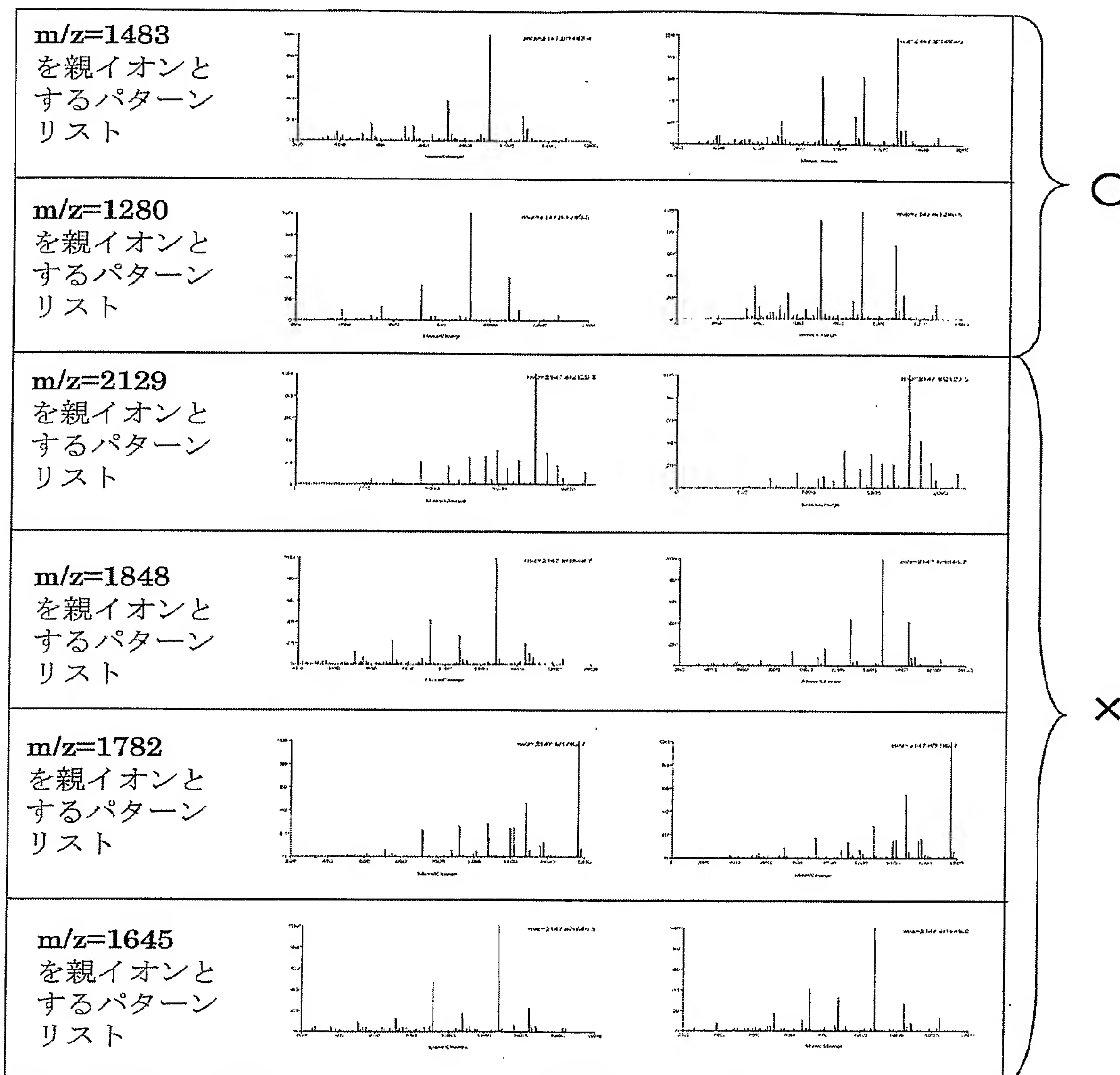


【図 3】



フラグメント パターン	類似度 $S((1/D)*1E+7)$	
	S1	S2
(a)	655.813	657.606
(b)	1535.890	1539.660
(c)	4570.276	4623.254
(d)	3717.617	3768.091

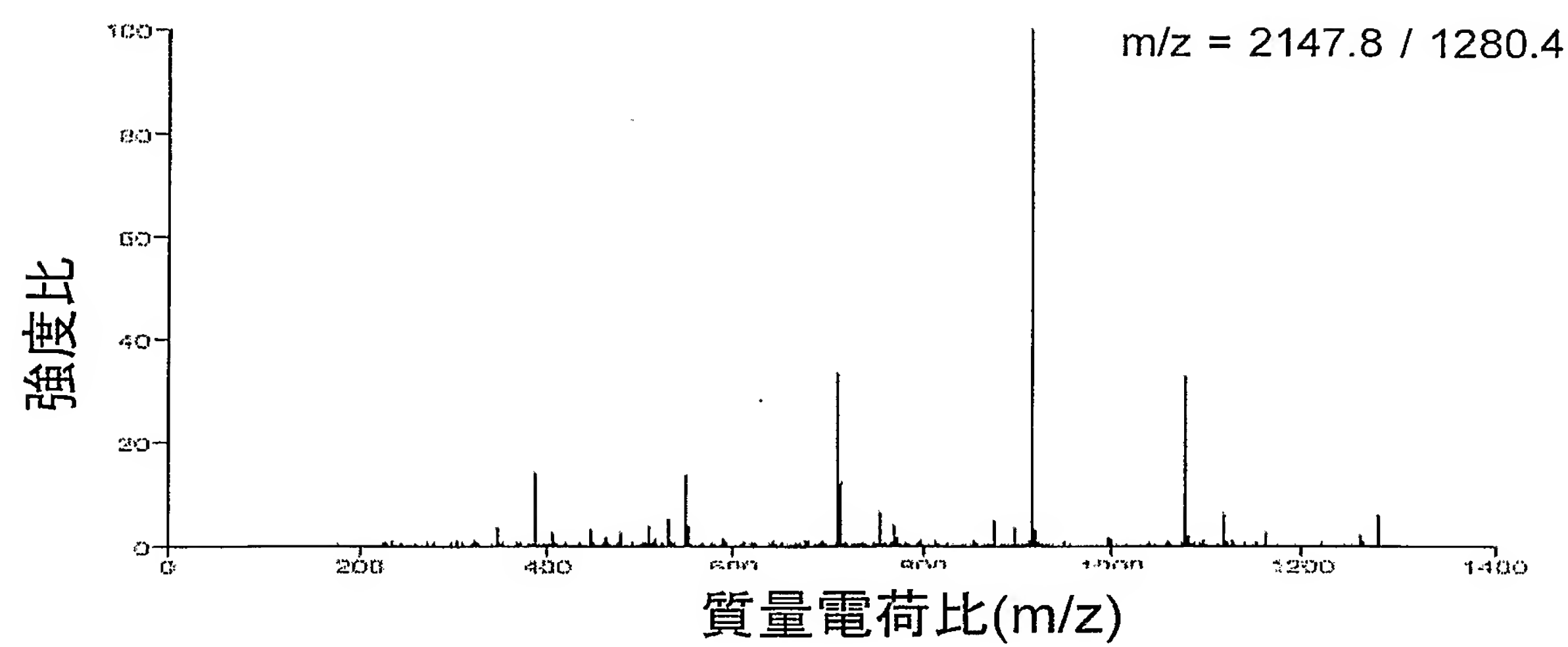
【図 4】



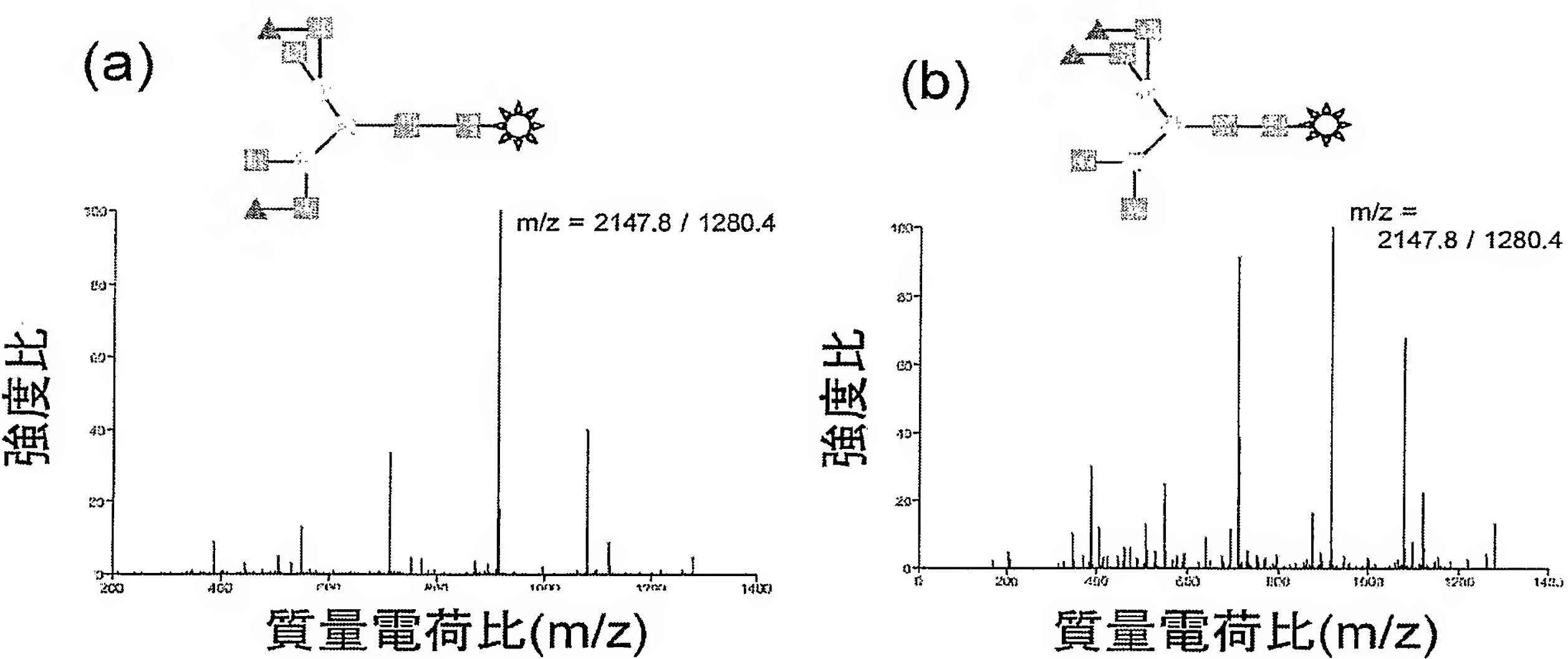
プレカーサ イオン	類似度 $S((1/D)*1E+7)$		順位
	S1	S2	
$m/z=1483$	1165.564	1149.987	2
$m/z=1280$	1140.334	1126.347	1
$m/z=2129$	9159.474	9079.574	—
$m/z=1848$	3039.331	2810.509	—
$m/z=1782$	7898.673	8011.952	—
$m/z=1645$	2881.634	2714.678	—



【図 5】

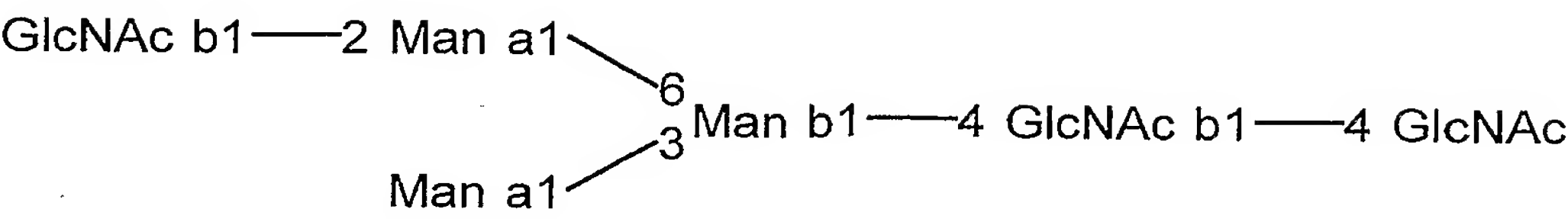


【図 6】

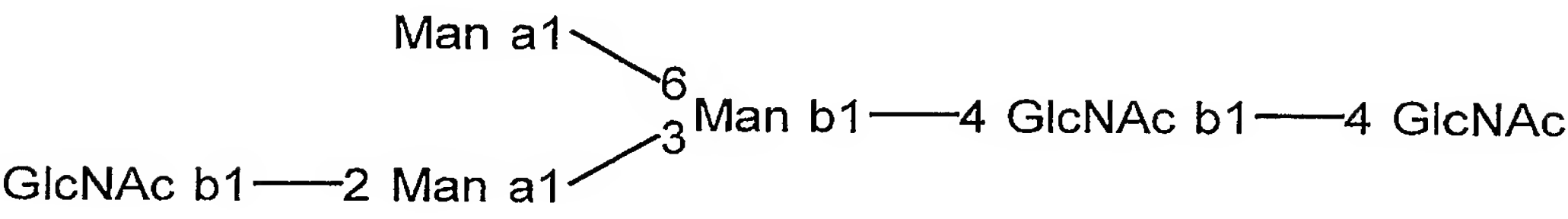


フラグメント パターン	類似度 $S((1/D)*1E+7)$		
	S1	S2	
(a)	45166.527	45592.317	○
(b)	1158.701	1138.003	×

【図 7】



(a) ONA—00001a(100.1)

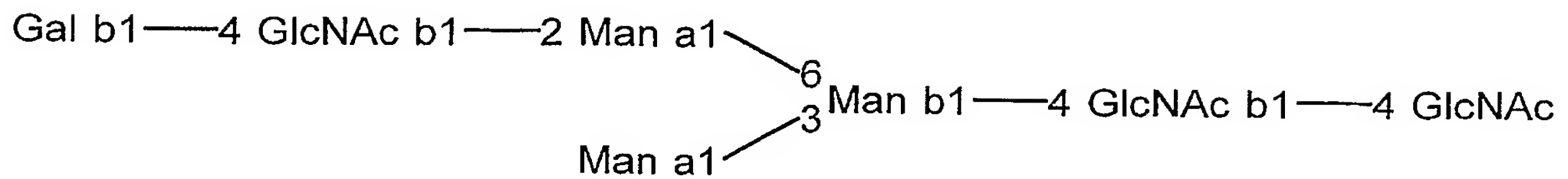


(b) ONA—00001b(100.2)

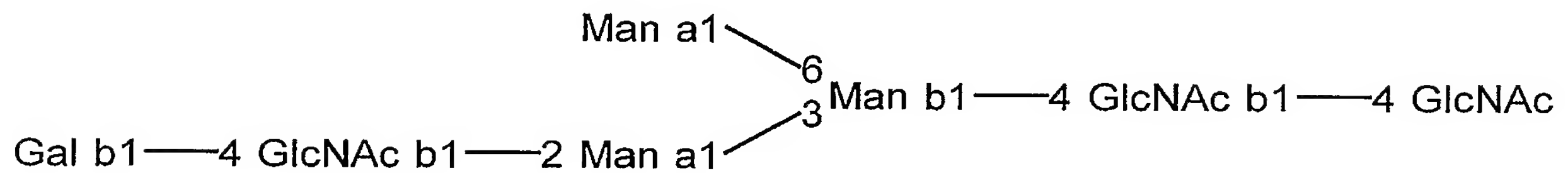
【図 8】

測定試料名	precursor ion	MS <sup>n</sup>	同一試料同士の相違度		違う構造で最も相違度の低いピークリスト	異性体間の相違度	
ONA-00001a(100.1)	1214	2	102.8163667	102.8163667	100.2PA-MS2-1214-1.txt	100.8827	100.9693
ONA-00001a(100.1)	915	3	156.28585	156.28585	100.2PA-MS3-915-1.txt	287.2622	297.0102
ONA-00001a(100.1)	1196	3	218.16315	218.16315	100.2PA-MS3-1196-1.txt	424.273	433.6466
ONA-00001b(100.2)	1214	2	87.27248333	87.27248333	100.1PA-MS2-1214-3.txt	100.319	100.8947
ONA-00001b(100.2)	915	3	297.8943833	297.8943833	100.1PA-MS3-915-3.txt	297.0102	287.2622
ONA-00001b(100.2)	1196	3	133.9454	133.9454	100.1PA-MS3-1196-1.txt	433.6466	424.273

【図 9】



(c) ONG-00001c(100.3)

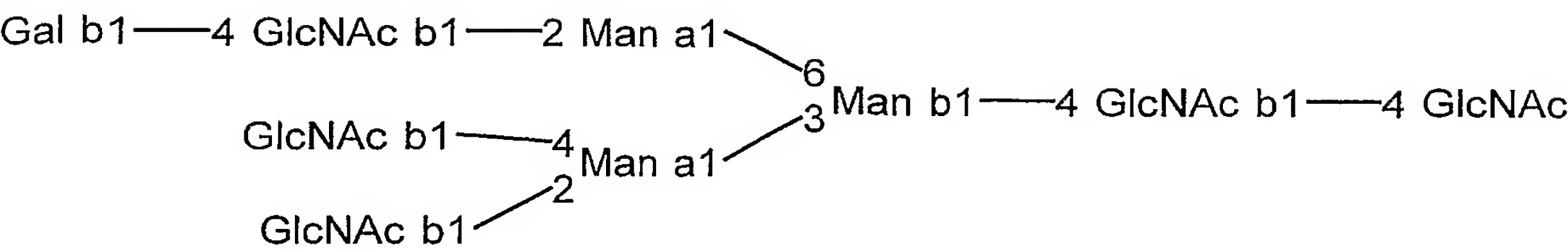


(d) ONG-00001d(100.4)

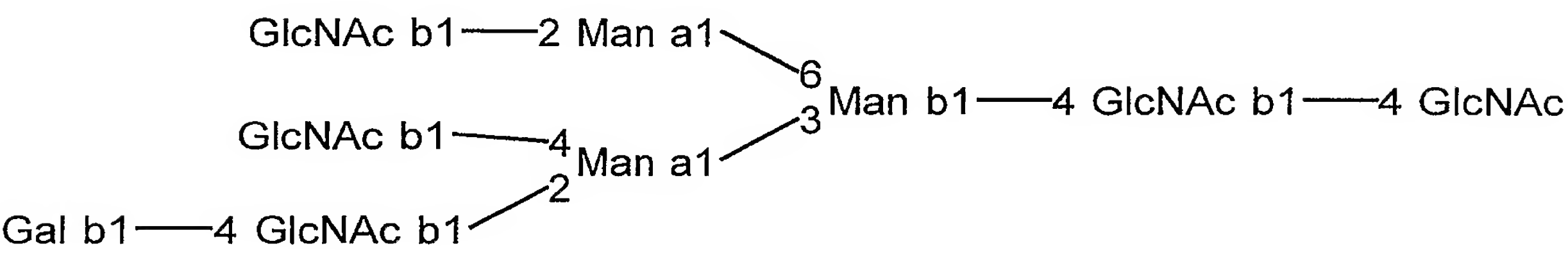
【图 10】

測定試料名	precursor ion	MS^n	同一試料同士の相違度		違う構造で最も相違度の近いピークリスト	異性体間の相違度	
ONG-00001c(100.3)	1376	2	119.2696	119.2696	100.4PA-MS2-1376-1.txt	216.5253	216.1344
ONG-00001c(100.3)	1077	3	38.76568333	38.76568333	100.1PA-MS3-915-2.txt	396.4621	467.2018
ONG-00001c(100.3)	1358	3	452.1632167	452.1632167	100.4PA-MS3-1358-3.txt	2720.1907	2722.5196
ONG-00001d(100.4)	1376	2	61.62873333	61.62873333	100.3PA-MS2-1376-2.txt	216.1344	216.5253
ONG-00001d(100.4)	1077	3	56.1829	56.1829	100.3PA-MS3-1077-1.txt	594.9353	593.819
ONG-00001d(100.4)	1358	3	207.8533167	207.8533167	100.3PA-MS3-1358-2.txt	2722.5196	2720.1907

【図 1 1】



(e) ONG-00001e(310.2)



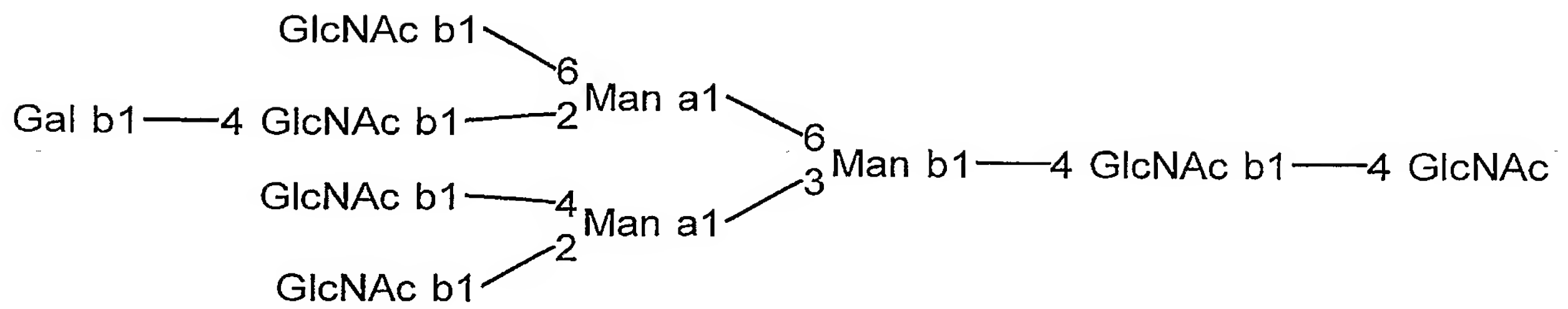
(f) ONG-00001f(310.3)

【図 1 2】

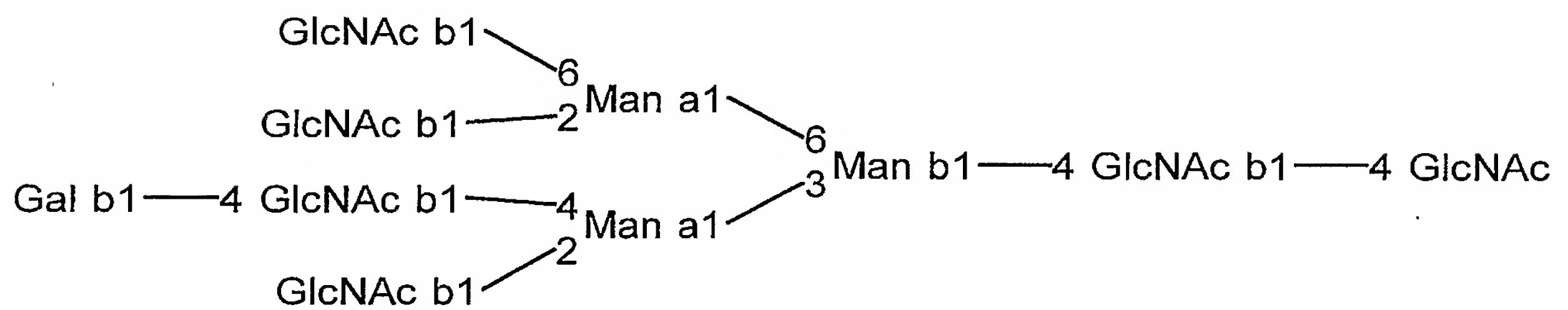
測定 試料名	precursor ion	MS <sup>n</sup>	同一試料同士の相違度		違う構造で最も相違度の近いピークリスト	異性体間の相違度	
ONG-00001e(310.2)	1928	2	312.2041667	312.2041667	310.3PA-MS2-1928-1.txt	160.0158	155.7346
ONG-00001e(310.2)	1280	3	655.3959833	655.3959833	310.3PA-MS3-1280-1.txt	1596.9166	1523.2752
ONG-00001e(310.2)	1483	3	174.4776167	174.4776167	310.3PA-MS3-1483-2.txt	119.2134	114.7385
ONG-00001f(310.3)	1928	2	205.0538167	205.0538167	310.2PA-MS2-1928-3.txt	155.7346	160.0158
ONG-00001f(310.3)	1280	3	290.52645	290.52645	100.2PA-MS3-1196-2.txt	1116.8702	1120.5336
ONG-00001f(310.3)	1483	3	327.5316067	327.5316067	310.2PA-MS3-1483-2.txt	114.7385	119.2134



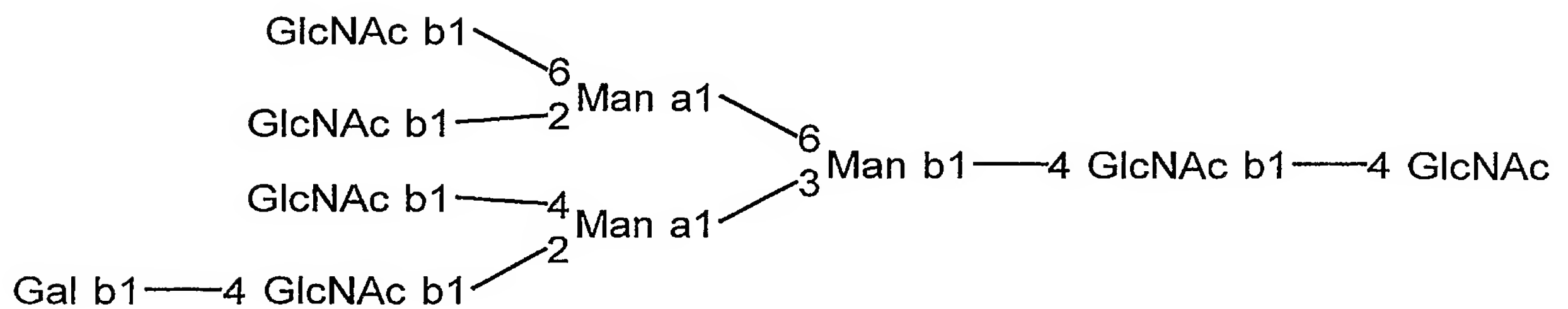
【図 1 3】



(a) ONG-000020(400.2)



(b) ONG-000021(400.3)

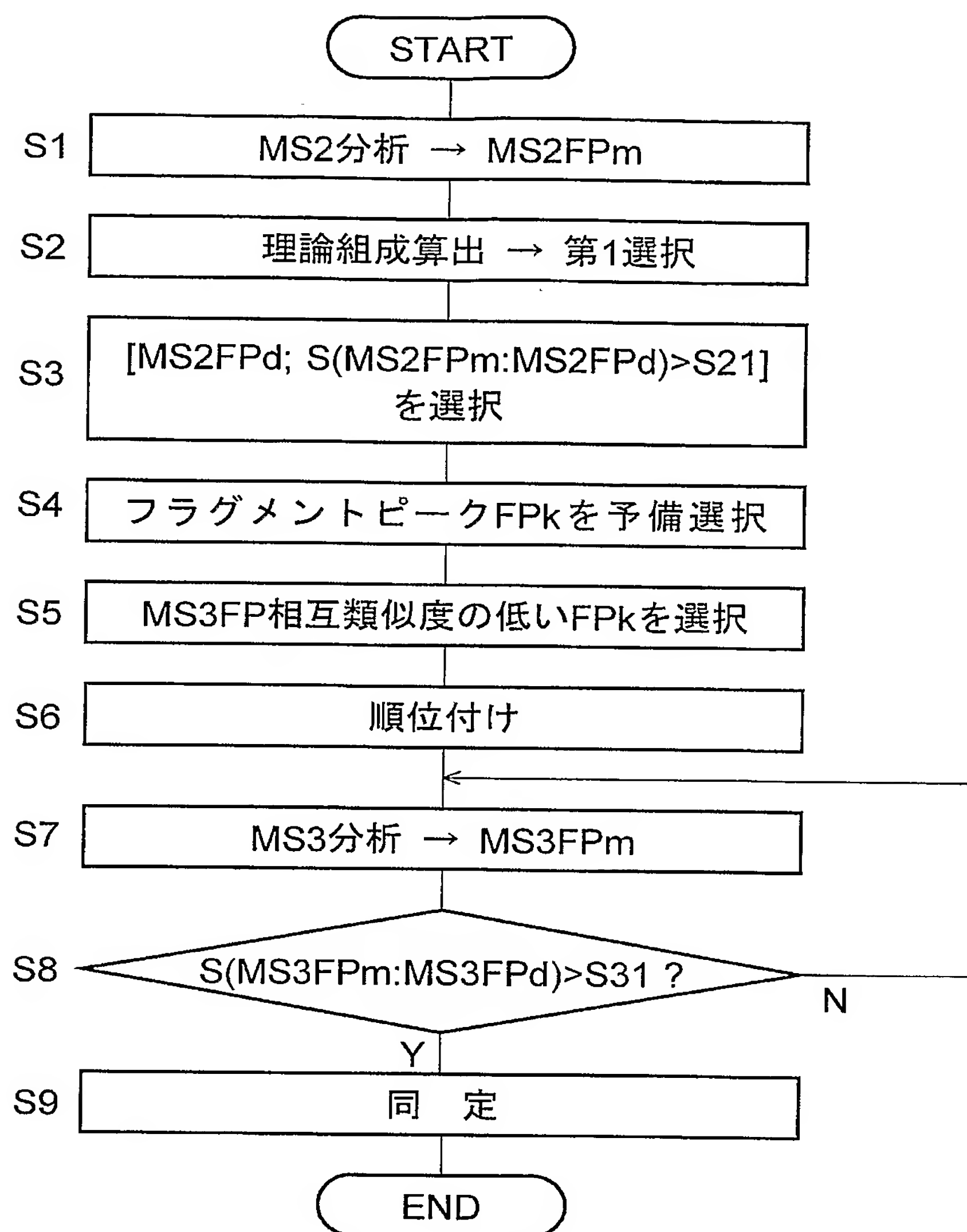


(c) ONG-000022(400.5)

【図 14】

測定 試料名	precursor ion	MS^n	同一試料同士の相違度		違う構造で最も相違度の近いピークリスト	異性体間の相違度	
ONG-000020(400.2)	1985	2	858.4422167	858.4422167	400.5PA-MS2-1985-2.txt	1864.9315	1859.783
ONG-000020(400.2)	1321	3	91.71695	91.71695	400.3PA-MS3-1321-3.txt	78.5283	72.082
ONG-000020(400.2)	1483	3	411.9361833	411.9361833	400.5PA-MS3-1483-3.txt	239.7108	267.7883
ONG-000020(400.2)	1602	3	969.9182	969.9182	400.5PA-MS3-1602-3.txt	1103.5193	1101.6843
ONG-000020(400.2)	1686	3	533.01535	533.01535	400.5PA-MS3-1686-2.txt	3936.2343	3955.8892
ONG-000020(400.2)	1764	3	378.8141	378.8141	400.5PA-MS3-1764-2.txt	4367.2301	4411.4233
ONG-000020(400.2)	1967	3	281.67725	281.67725	10000以下のスペクトル無し		
ONG-000021(400.3)	1985	2	455.7612167	455.7612167	400.5PA-MS2-1985-1.txt	257.98	250.1656
ONG-000021(400.3)	1321	3	123.00805	123.00805	400.5PA-MS3-1321-1.txt	42.8943	45.8055
ONG-000021(400.3)	1483	3	256.8724167	256.8724167	310.2PA-MS3-1483-3.txt	1801.5073	1739.7947
ONG-000021(400.3)	1602	3	338.1913972	338.1913972	400.5PA-MS3-1602-1.txt	353.2306	352.4087
ONG-000021(400.3)	1686	3	307.1847167	307.1847167	400.5PA-MS3-1686-3.txt	3834.4255	3836.0349
ONG-000021(400.3)	1764	3	813.7935	813.7935	400.5PA-MS3-1764-1.txt	5369.3515	5352.7886
ONG-000021(400.3)	1967	3	800.1308	800.1308	400.5PA-MS3-1967-2.txt	6323.3696	6343.6005
ONG-000022(400.5)	1985	2	283.9350667	283.9350667	400.3PA-MS2-1985-2.txt	250.1656	257.98
ONG-000022(400.5)	1321	3	106.6899667	106.6899667	400.3PA-MS3-1321-2.txt	45.8055	42.8943
ONG-000022(400.5)	1483	3	256.8044	256.8044	400.2PA-MS3-1483-3.txt	267.7883	239.7108
ONG-000022(400.5)	1602	3	700.73915	700.73915	400.3PA-MS3-1602-3.txt	352.4087	353.2306
ONG-000022(400.5)	1686	3	720.2411167	720.2411167	400.3PA-MS3-1686-1.txt	3836.0349	3834.4255
ONG-000022(400.5)	1764	3	1014.059233	1014.059233	400.2PA-MS3-1764-2.txt	4411.4233	4367.2301
ONG-000022(400.5)	1967	3	513.7448222	513.7448222	400.3PA-MS3-1967-3.txt	6343.6005	6323.3696

【図 15】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 微量のサンプルで、簡便且つ迅速に糖鎖の完全な一次構造を決定することのできる、糖鎖構造解析システムを提供する。

**【解決手段】** 分析目的糖鎖を開裂質量分析することにより得られる測定MS2フラグメントパターンに含まれる各MS2フラグメントイオンの更に開裂質量分析パターンである測定MS3フラグメントパターンをデータベースに記憶されている参照MS3フラグメントパターンと照合することにより分析目的糖鎖構造の同定を行う、質量分析装置を用いた糖鎖構造同定方法において、測定MS2フラグメントパターンに含まれる複数のMS2フラグメントイオンのうち、データベースに記憶されている、その質量電荷比をプリカーサイオン質量電荷比とする複数の参照MS3フラグメントパターンの相互の類似度が所定値以下の測定MS2フラグメントイオンのみを開裂質量分析するようにする。

**【選択図】** 図 1 5



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1
受付番号	5 0 4 0 0 4 5 9 4 5 1
書類名	特許願
担当官	笹川 友子 9 4 8 2
作成日	平成 1 6 年 3 月 2 2 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	301021533
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
【氏名又は名称】	独立行政法人産業技術総合研究所

## 【特許出願人】

【識別番号】	599000980
【住所又は居所】	東京都中野区東中野 2 丁目 7 番 1 4 号
【氏名又は名称】	三井情報開発株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】	000001993
【住所又は居所】	京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地
【氏名又は名称】	株式会社島津製作所

## 【代理人】

【識別番号】	100095670
【住所又は居所】	京都府京都市下京区東洞院通四条下ル元悪王子町 3 7 番地 豊元四条烏丸ビル小林特許商標事務所
【氏名又は名称】	小林 良平

特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 0 6 3 7 6 6 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 9 日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消  
[統合先識別番号] 3 0 1 0 2 1 5 3 3  
住 所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1  
氏 名 独立行政法人 産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 9 日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合  
[統合元識別番号] 5 0 3 0 6 3 7 6 6  
住 所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1  
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 9 0 0 0 9 8 0 ]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 1 2 月 2 5 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中野区東中野 2 丁目 7 番 1 4 号
氏 名	三井情報開発株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 9 3 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所



特願 2 0 0 4 - 0 8 0 6 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所